

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

1c872 U.S. PTO
09/758317
01/12/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 1月12日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-003386

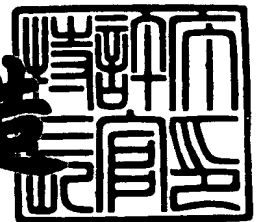
出 願 人
Applicant (s):

株式会社日本触媒

2001年 1月 5日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3109235

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99-0676

【提出日】 平成12年 1月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/00

【発明の名称】 光学活性シアノヒドリンの合成方法

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社
日本触媒 筑波研究所内

【氏名】 仙波 尚

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社
日本触媒 筑波研究所内

【氏名】 ▲土▼▲橋▼ 幸生

【特許出願人】

【識別番号】 000004628

【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406568

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性シアノヒドリンの合成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 S-ヒドロキシニトリルリアーゼが、多孔性無機材料からなる担体に固定化されてなることを特徴とする固定化酵素。

【請求項 2】 多孔性無機材料からなる担体が、粘土系焼結担体、シリカ系担体、アルミナ系担体及びシリカアルミナ系担体のいずれかであることを特徴とする請求項 1 記載の固定化酵素。

【請求項 3】 多孔性無機材料からなる担体が、10～80nmの細孔径を有するものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の固定化酵素。

【請求項 4】 S-ヒドロキシニトリルリアーゼが、トウダイグサ科植物、イネ科植物又はボロボロノキ科植物由来のものである請求項 1～3 のいずれかに記載の固定化酵素。

【請求項 5】 S-ヒドロキシニトリルリアーゼを多孔性無機材料からなる担体に固定化することを特徴とする固定化酵素の製造方法。

【請求項 6】 多孔性無機材料からなる担体が、粘土系焼結担体、シリカ系担体、アルミナ系担体及びシリカアルミナ系担体のいずれかであることを特徴とする請求項 5 記載の固定化酵素の製造方法。

【請求項 7】 多孔性無機材料からなる担体が、10～80nmの細孔径を有するものであることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載の固定化酵素の製造方法。

【請求項 8】 S-ヒドロキシニトリルリアーゼが、トウダイグサ科植物又はイネ科植物由来のものである請求項 5～7 のいずれかに記載の固定化酵素の製造方法。

【請求項 9】 請求項 1～4 のいずれかに記載の固定化酵素を、水に難溶性又は不溶性の有機溶媒存在下で、カルボニル化合物及びシアン化合物と接触させることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法。

【請求項 10】 固定化酵素が、光学活性シアノヒドリン生成反応終了後の反応液から回収され再使用されるものであることを特徴とする請求項 9 記載の光学活性シアノヒドリンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、固定化担体に高い吸着率でS-ヒドロキシニトリルリアーゼが固定化された固定化酵素、該固定化酵素の製造方法及び該固定化酵素を用いる光学活性シアノヒドリンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

S-ヒドロキシニトリルシアーゼは、光学活性シアノヒドリン合成用の酵素として有用である。通常、使用する反応系は有機溶媒系であることから、有機溶媒不溶性の酵素を反応系に分散させ、効率よく反応を行うための方法として、固定化酵素として使用することが挙げられる。S-ヒドロキシニトリルシアーゼを固定化した例としては、微小なセルロース粉末やニトロセルロースに固定化したものが報告されている。しかし、これらセルロース系の担体は、酵素の吸着率が低く、反応に必要な量の酵素を固定するには担体が極めて多量に必要なことなどの不都合が存在する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、固定化担体に高い吸着率でS-ヒドロキシニトリルリアーゼが固定化された固定化酵素、該固定化酵素の製造方法及び該固定化酵素を用いる光学活性シアノヒドリンの製造方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、酵素の固定化担体として、粘土系焼結担体、シリカ系担体、アルミナ系担体及びシリカアルミナ系担体などの多孔性無機担体を用いることによって、S-ヒドロキシニトリルリアーゼを高い吸着率で固定することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、S-ヒドロキシニトリルリアーゼが多孔性無機材料からなる担体（例えば、粘土系焼結担体、シリカ系担体、アルミナ系担体、シリカアルミナ系担体であって、10～80nmの細孔径を有するもの）に固定化されていることを特徴とする固定化酵素である。ここで、S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、トウダイグサ科植物、イネ科植物又はボロボロノキ科植物由来のものを用いることができる。

【0006】

さらに、本発明は、S-ヒドロキシニトリルリアーゼを多孔性無機材料からなる担体（例えば粘土系焼結担体、シリカ系担体、アルミナ系担体、シリカアルミナ系担体であって、10～80nmの細孔径を有するもの）に固定化することを特徴とする固定化酵素の製造方法である。ここで、S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、トウダイグサ科植物又はイネ科植物由来のものを用いることができる。

【0007】

さらに、本発明は、前記固定化酵素を、水に難溶性又は不溶性の有機溶媒存在下で、カルボニル化合物及びシアン化合物と接触させることを特徴とする光学活性シアノヒドリンの製造方法である。ここで、該固定化酵素は、反応液から回収され再使用されるものであり得る。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の固定化酵素は、S-ヒドロキシニトリルリアーゼを多孔性無機材料からなる担体に吸着させた固定化酵素である。本固定化酵素は、S-ヒドロキシニトリルリアーゼをセルロース系固定化担体に吸着させた従来の固定化酵素よりも、担体への酵素吸着率が高いという特徴を有する。固定化担体への吸着率が格段に高い固定化酵素である。本発明の固定化酵素は、以下のようにして製造することができる。

【0009】

1. S-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

固定化の対象となるS-ヒドロキシニトリルリアーゼは、当該酵素を含む植物な

ど生物組織からの抽出法や遺伝子工学的手法によって調製することができる。S-ヒドロキシニトリルリアーゼの大量且つ安定的な供給のためには、S-ヒドロキシニトリルリアーゼは遺伝子工学的手法によって調製することが好ましい。遺伝子工学的手法によるS-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製は、例えば、以下のよう
にして行うことができる。

【0010】

(1) S-ヒドロキシニトリルリアーゼをコードする遺伝子の供給源

S-ヒドロキシニトリルリアーゼをコードする遺伝子（以下S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子ともいう）の供給源としては、キャッサバ (Manihot esculenta)、パラゴムノキ (Hevea brasiliensis) などのトウダイグサ科植物、モロコシピカラー (Sorghum bicolor) などのイネ科植物、キシメニア (Ximenia americana) などのボロボロノキ科植物などが挙げられる。また、それ以外にも、S-ヒドロキシニトリルリアーゼを含有するあらゆる生物を、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子の供給源として用いることができる。

【0011】

(2) S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子のクローニング

S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子は、上記(1)に記載の供給源から、以下のよう
にしてクローニングすることができる。すなわち、まず常法に従って生物体からcDNAを調製する。一方、PCRによるS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子増幅用のプライマーを、公知のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子の塩基配列に基づいて設計・合成する。例えば、キャッサバ由来S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子増幅用プライマーは、文献 [Arch. Biochem. Biophys. 311, 496-502 (1994)] に記載の塩基配列に基づき、以下のようなプライマーとすることができる。

センスプライマー： 5'-ggggaattcatggtactgcacattttgttctgattc-3' (配列番号1)

アンチセンスプライマー： 5'-ggggtcgacctcacggattagaagccgccg-3' (配列番号2)

【0012】

次いで、合成した増幅用プライマーを用い、上記(1)の生物から常法によって調製したcDNAを鋳型として、PCRによってS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子を増幅する。得られたPCR増幅断片を適当なベクターに連結後、塩基配列を確認し、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子の塩基配列を有するものをS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子含有クローンとする。

【 0 0 1 3 】

(3) S-ヒドロキシニトリルリアーゼ発現ベクターの構築

S-ヒドロキシニトリルリアーゼ発現ベクターの構築は、上記(2)において得られたS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子含有クローンから、S-ヒドロキシニトリルリアーゼをコードする領域を切り出し、適当な発現ベクターに連結することにより構築することができる。ここで用いる発現ベクターは、S-ヒドロキシニトリルリアーゼタンパク質の発現に使用する宿主の種類に応じて選択する。例えば、酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主とする場合には、YEp51、YEp351、pYES2などのエピソード型発現ベクターを用いることができ、大腸菌を宿主として使用する場合には、pKK223-3、pKK233-2、pTrc99Aなどを用いることができる。

【 0 0 1 4 】

(4) S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子を含む形質転換体の作製

S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子を含む形質転換体は、上記(3)において得られたS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子発現ベクターを宿主細胞に形質転換することにより作製することができる。すなわち、酵母サッカロマイセス・セレビシエへの形質転換は、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法などによって行うことができ、大腸菌への形質転換は、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法などによって行うことができる。所望の形質転換体の選抜は、形質転換操作の後、適当な選択培地上に形質転換処理物を播種し、生育してきた菌株を選択することによって行うことができる。

【 0 0 1 5 】

(5) S-ヒドロキシニトリルリアーゼタンパク質の調製

S-ヒドロキシニトリルリアーゼタンパク質は、上記(4)において得られた形質

転換体を培地に培養し、その培養物を採取することにより得ることができる。培養物とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破碎物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【 0 0 1 6 】

例えば、酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、導入したS-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子が安定に保持され、且つ該遺伝子の発現によってS-ヒドロキシニトリルリアーゼが生産されるものであれば、特に限定されない。宿主の性質及び導入した選択マーカー遺伝子の性質によって培養に用いる炭素源及び／又はアミノ酸組成及び／又は添加物の組成を調整することが好ましい。培養は、宿主の生育を阻害しない温度及びpH（通常30℃、pH 4～8）において、菌体によるS-ヒドロキシニトリルリアーゼの生産が停止するまで行う。

【 0 0 1 7 】

培養後、S-ヒドロキシニトリルリアーゼタンパク質が菌体内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することにより該タンパク質を抽出する。また、酵素タンパク質が菌体外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離などにより菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーなどを単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中からS-ヒドロキシニトリルリアーゼタンパク質を精製することができる。

【 0 0 1 8 】

2. S-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化

(1) S-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化担体

S-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化担体としては、各種の多孔性無機材料からなる担体を使用することができる。例えば、多孔性無機材料からなる固定化担体としては、粘土系焼結担体、シリカ系担体、アルミナ系担体、シリカアルミナ系担体などが挙げられる。

【 0 0 1 9 】

上記粘土系焼結担体とは、ケイ酸塩類原料（例えば、カオリナイト、ディッカイト、ナクライト、ハロイサイトなどのカオリナイト族鉱物、パイロフィライト、モンモリロナイト、絹雲母、滑石、緑泥石などの粘土系のものなど）を造粒し、焼結して得られる多孔性担体をいう。具体的には、Toyonite200（東洋電化工業社製）、Toyonite200A（東洋電化工業社製）などが挙げられる。

【 0 0 2 0 】

上記シリカ系担体とは、二酸化ケイ素の微粒子が凝集してできた高表面積の多孔性担体をいう。具体的には、Micro Bead Silica Gel（富士シリシア化学社製）、Chromatography Silica Gel（富士シリシア化学社製）などが挙げられる。

【 0 0 2 1 】

上記アルミナ系担体とは、酸化アルミニウムを主成分とする多孔性担体をいう。具体的には、NeoBead DL（水沢化学工業）、 γ -アルミナ KHA-34（住友化学工業社製）などが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

上記シリカアルミナ系担体とは、酸化アルミニウムと二酸化ケイ素とを主成分とする多孔性担体をいう。具体的には、ミズカシーブスY-540 Y型ゼオライト（水沢化学工業社製）、ミズカシーブス 13X-488 ゼオライト13X（水沢化学工業社製）、HSZ-630H0A H-モルデナイト（東ソー社製）、Na-モルデナイト（触媒化成社製）などが挙げられる。

【 0 0 2 3 】

上記多孔性無機材料担体は、酵素の吸着量が担体の細孔径によって左右されることから、酵素を充分固定化するために有効な細孔径の担体を選択することが好ましい。具体的には、細孔径が10～80nm、好ましくは10～60 nm、最も好ましくは10～40 nmのものを選択する。さらに、多孔性無機材料は、より多くの酵素を固定化することができるように、比表面積が、より大きいことが好ましく、具体的には $20\text{m}^2/\text{g}$ 以上であることが好ましい。また、固定化に用いる場合の担体の形状は、多孔性であれば特に限定されないが、充填型反応槽用の固定化酵素を作製する場合には球状であることが好ましい。粒径は固定化酵素の分離作業性の面、

あるいは充填型反応装置の場合では通液の圧力損失の面を考慮すると、粒度分布が比較的狭く、粒径は $10\mu\text{m}$ ～ 5mm 、好ましくは $100\mu\text{m}$ ～ 2mm であることが好ましいが、その限りではない。

【 0 0 2 4 】

(2) 担体へのS-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化

担体へのS-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化は以下のようにして行うことができる。すなわち、上記1において調製したS-ヒドロキシニトリルリアーゼを含む溶液を酵素活性が損なわれない範囲のpHに調整した後、上記(1)の固定化担体と混合し、吸着率が最大となるまで攪拌・放置することにより固定化する。通常、6～24時間の攪拌・放置時間で最大の吸着率を達成することができる。なお、担体への酵素の吸着は、塩濃度が高い程、抑制される傾向があるため、固定化時の塩濃度は低くすることが好ましい。例えば、固定化時の塩濃度は 0.5M 以下、好ましくは 0.1M 以下で行う。次いで、固定化処理後、得られた固定化酵素は、濾過などによって分離することができる。なお、固定化酵素は過剰に水分を含んだ状態では、光学活性シアノヒドリンの合成時に反応溶媒中で担体同志が凝集する原因となるので、固定化酵素中に含まれる水分は、分散可能なレベルまで除去することが好ましい。固定化酵素からの水分の除去は、減圧乾燥、通風乾燥などによって行うことができる。

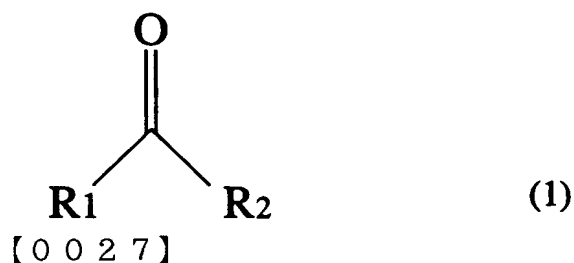
【 0 0 2 5 】

3. 本発明の固定化酵素を用いた光学活性シアノヒドリンの合成

本発明の固定化酵素を用いた光学活性シアノヒドリンの合成は、以下のようにして行うことができる。すなわち、まず、反応溶媒中に、上記2において得られた固定化酵素及び反応基質を加え、反応温度 $10\sim 50^{\circ}\text{C}$ において、20分間～24時間反応させることによって、光学活性シアノヒドリンを合成することができる。反応時間は、基質の転換速度に応じて適宜調整する。合成反応終了後、固定化酵素は、回収し、再度光学活性シアノヒドリンの合成に使用することができる。ここで、反応基質としては、カルボニル化合物及びシアン化合物を使用する。ここで、カルボニルアル化合物とは、アルデヒドまたはケトンをいい、具体的には、下記式(1)で表される。

【 0 0 2 6 】

【化 1】



上記式(1)において、R 1 と R 2 は、(i) 水素原子、(ii)置換または非置換の炭素数 1～18の線状または分枝鎖状の飽和アルキル基、または(iii) 置換または非置換の環員が 5～22の芳香族基である。ただし、R 1 と R 2 は同時に水素原子を表すことはない。

【 0 0 2 8 】

上記(ii)で、R 1 と R 2 が置換アルキル基の場合、置換基は、1個またはそれ以上のアミノ基、イミノ基、ヒドロキシ基、炭素数 1～8のアルコキシ基、ハロゲン、カルボキシル基、炭素数 3～20のシクロアルキル基、または N、O、Sのヘテロ原子で置換されていてもよい炭素数22までの芳香属基である（ここで、置換基が環状置換基の場合は、それ自体が1個またはそれ以上のハロゲン、ヒドロキシ基、炭素数 1～8の線状若しくは分枝鎖状のアルキル基、炭素数 2～8の線状若しくは分枝鎖状のアルケニル基で置換されていてもよい。）。

【 0 0 2 9 】

上記(iii)で、芳香族基は、環員の4個までがN、Oおよび／またはSによって置換されているヘテロ芳香族基であってもよい。また、R 1 と R 2 が置換芳香族基の場合、置換基は、1個またはそれ以上のアミノ基、イミノ基、ヒドロキシ基、炭素数 1～8のアルコキシ基、アリルオキシ基、ハロゲン、カルボキシル基、炭素数22までの線状若しくは分枝鎖状の飽和若しくは不飽和のアルキル基である（ここで、一つの芳香族基が少なくとも2個の置換基により置換されてもよい）。

【 0 0 3 0 】

さらに、反応系に基質として添加するシアン化合物としては、シアン化物イオ

ン (CN⁻) を生じる物質であれば、特に限定されず、例えば、シアン化ナトリウムやシアン化カリウムなどのシアン化水素塩、アセトンシアンヒドリンなどのシアノヒドリン類などが挙げられる。

【 0 0 3 1 】

さらに、反応溶媒としては、反応系内に水が大量に存在すると、酵素反応によって生成した光学活性シアノヒドリンのラセミ化が起こりやすくなったり、水に対する溶解度の小さいアルデヒドまたはケトン为原料として用いる場合には生産効率が低下するなどの点から、水に難溶または不溶である有機溶媒を主成分としてなる反応溶媒を用いることが好ましい。かかる有機溶媒としては、酵素反応による光学活性シアノヒドリンの合成反応に影響を与えないものであれば特に制限なく用いることができ、合成反応に用いる原料のアルデヒドまたはケトンの物性、生成物であるシアノヒドリンの物性に応じて適宜選択することができる。具体的には、ハロゲン化されていてもよい脂肪族または芳香族の直鎖状または分枝状または環状の飽和または不飽和炭化水素系溶媒、例えば、ペンタン、ヘキサン、トルエン、キシレン、塩化メチレンなど；ハロゲン化されていてもよい脂肪族または芳香族の直鎖状または分枝状または環状の飽和または不飽和アルコール系溶媒、例えば、イソプルピルアルコール、*n*-ブタノール、イソブタノール、*t*-ブタノール、ヘキサノール、シクロヘキサノール、*n*-アミルアルコールなど；ハロゲン化されていてもよい脂肪族または芳香族の直鎖状または分枝状または環状の飽和または不飽和エーテル系溶媒、例えば、ジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソピルエーテル、ジブチルエーテル、メチル-*t*-ブチルエーテルなど；ハロゲン化されていてもよい脂肪族または芳香族の直鎖状または分枝状または環状の飽和または不飽和エステル系溶媒、例えば、ギ酸メチル、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、プロピオン酸メチルなどが挙げられ、これらを単独で用いても、また複数を混合して用いてもよい。また、上記溶媒は水又は水系の緩衝液を含有又は飽和させたものを用いることもできる。

【 0 0 3 2 】

さらに、本発明においては、固定化酵素の安定化を図る目的で、光学活性シアノヒドリン合成反応の反応系内の酸素濃度を減ずる処理、該反応系内のハイドロ

キノン及びハイドロキノンより誘導される化合物（ベンゾキノン、キンヒドロノなど）を減ずる処理のいずれか、又は両方を行うことができる。

【 0 0 3 3 】

本発明において、反応系内の酸素濃度を減ずる処理は、具体的には、反応溶媒と反応に影響を与えない気体（窒素、アルゴン、ヘリウムなど）とを接触させ、反応溶媒中で溶存酸素を上記気体と置換することにより、溶存酸素を減ずる処理をいう。この反応系内の溶存酸素濃度を減ずる処理は、常法に従って行えばよく、例えば、攪拌機能を持つ容器に反応溶媒を入れ、攪拌下、液中に上記の不活性な気体を通気することで行うことができる。具体的には、反応溶媒 1 L 当り、上記不活性な気体を毎分 1 ml ～ 10 L の通気量で 1 分間 ～ 1 時間、好ましくは、反応溶媒 1 L 当り、毎分 10 ml ～ 5 L の通気量で 5 ～ 30 分間通気処理することで行うことができる。あるいは、上記の不活性な気体の雰囲気下で、反応溶媒を蒸留することでも行うことができる。また、亜硫酸ナトリウム、ハイドロサルファイトなどの脱酸素剤を加えることによっても行うことができる。さらに、反応容器の気相部分に不活性な気体を上記の通気量で通気しながら反応させることによっても行うことができる。

【 0 0 3 4 】

本発明において、反応系内のハイドロキノン及びハイドロキノンより誘導される化合物の濃度を減ずる処理は、反応溶媒を蒸留し、反応溶媒に含まれるハイドロキノン、又はハイドロキノンより誘導される化合物と分離させることにより行う。ハイドロキノン及びハイドロキノンより誘導される化合物の濃度は、40 ppm 未満、好ましくは 1 ppm 未満に減ずることが好ましい。蒸留は、常圧又は減圧下、ハイドロキノン及びハイドロキノンより誘導される化合物が残留し、反応溶媒のみが蒸留分離される温度条件で実施すればよい。あるいは、上記処理は、活性炭などの吸着剤を使い、ハイドロキノン及びハイドロキノンより誘導される化合物を反応溶媒に投入するか、吸着剤を充填したカラムなどに溶媒を通液するか、あるいはその他の方法で反応溶媒と吸着剤とを一定時間接触させることによっても実施することができる。その場合、吸着剤の投入量は、その吸着剤の吸着能力に応じて適宜決定される。

【 0 0 3 5 】

次いで、生成された光学活性シアノヒドリンは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等によって測定・定量することができる。

【 0 0 3 6 】

【実施例】

以下に、本発明を実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 3 7 】

〔実施例 1〕 S-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

S-ヒドロキシニトリルリアーゼは、酵母サッカロマイセス・セレビシエを宿主として用い、遺伝子工学的に調製した。すなわち、まず、キャッサバの葉から常法に従って、全 mRNA を抽出した。次いで、得られた mRNA を鋳型として、cDNA 合成を行い、cDNA を作製した。一方、文献 [Arch. Biochem. Biophys. 311, 496-502 (1994)] に記載のキャッサバ由来の S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子の配列に基づいて、下記のプライマーを合成した。

センスプライマー : ggggaattcatggttaactgcacattttgttctgattc (配列番号 1)

アンチセンスプライマー : ggggtcgacctcacggattagaagccgccg (配列番号 2)

【 0 0 3 8 】

合成したプライマーを用い、上記 cDNA を鋳型として PCR (90℃、30 秒 ; 55℃、30 秒 ; 72℃、60 秒 ; 計 35 サイクル) を行い、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子を獲得した。遺伝子配列の解析を行ったところ、文献に示されている配列と一致した。

【 0 0 3 9 】

次いで、得られた PCR 断片を発現ベクター YEp352-GAP のプロモーターとターミネーターとの間に挿入することにより、酵母エピソード型発現ベクター YEp352-GC を作製した。これを酵母サッカロマイセス・セレビシエ Inv-Sc1 株へ、常法によって形質転換し、ウラシルを含まない最少選択培地において増殖する株を選択することによって発現ベクター YEp352-GC を含む組換え酵母菌 YEp352-GC-S2 株を得た。

【 0 0 4 0 】

次いで、得られた組換え酵母菌株 YEp352-GC-S2 株を、YNBDCas 液体培地 (6.7g/L Yeast nitrogen base without amino acid (Difco 社製)、20g/L グルコース、20g/L カザミノ酸、40mg/mL L-トリプトファン) 中で 24 時間培養することによって、細胞内に S-ヒドロキシニトリルリアーゼを生産させた。組換え菌培養液から遠心分離によって菌体を回収し、ビーズミルを用い、菌体を破碎した。破碎菌体液を遠心分離し、粗酵素液を調製、これを硫酸分画することによって粗精製したものを S-ヒドロキシニトリルリアーゼ溶液として、以下の実施例に使用した。

【 0 0 4 1 】

〔実施例 2〕 S-ヒドロキシニトリルリアーゼ固定化担体の検討

(1) 粘土系焼結担体及びシリカ系担体への固定化

実施例 1 において調製した S-ヒドロキシニトリルリアーゼを、各種の酵素固定化担体に固定化し、該酵素の固定化に適した固定化担体の種類について検討した。酵素の固定化は、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ溶液 (活性: 64U/ml、0.02M HEPES-Na 緩衝液 (pH6.0)) 0.5ml に、各種担体 0.1g をそれぞれ加え、4℃ で 24 時間攪拌することにより、酵素タンパク質を担体に吸着固定することにより行った。次いで、担体への酵素タンパク質の吸着率を調べた。担体への酵素タンパク質の吸着率は、固定化後の上澄み液中の残存 S-ヒドロキシニトリルリアーゼ活性 (残存活性) と対照 (担体を加えていない酵素混合液) 中の S-ヒドロキシニトリルリアーゼ活性 (対照活性) とを測定し、下式に代入することによって算出した。結果を表 1 に示した。酵素活性は、DL-マンデロニトリルを基質として、基質が酵素によって分解されてベンズアルデヒドを生成する際の吸光度変化を 249.6nm の波長で測定することによって算出した。ここで、1 単位 (U; unit) は 1 分間にベンズアルデヒド 1 μ mol を生成する活性と定義した。

【 0 0 4 2 】

式 (1)

$$\text{吸着率 (\%)} = \frac{\text{対照活性} - \text{残存活性}}{\text{残存活性}} \times 100$$

【 0 0 4 3 】

【表 1】

各種固定化担体への酵素の吸着率

固定化担体	材質	残存活性 (U/ml)	吸着率 (%)
Toyonite 200(東洋電化工業社製)	粘土系焼結	0	100
Chromatography Silica Gel FL60D(富士シリシア化学社製)	シリカ系	0.071	99.88
Avicel Cellulose Microcristalline(Merck社製)	セルロース系	48.63	20.19
セルロース w-200G(日本製紙社製)	セルロース系	54.99	9.75
対照	—	60.93	—

【 0 0 4 4 】

従来よりS-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化担体として知られる、セルロース系固定化担体への吸着率は、Avicel Cellulose Microcristalline(Merck社製)が20.19%、セルロース w-200G(富士シリシア化学株式会社製)が9.75%であったのに対し、粘土系焼結担体のToyonite 200(東洋電化工業社製)への吸着率は100%、シリカ系担体のChromatography Silica Gel FL60D(富士シリシア化学社製)への吸着率は99.88%であった。

【 0 0 4 5 】

(2) その他の多孔性無機材料からなる担体への固定化

さらに広範な多孔性無機材料からなる担体へのS-ヒドロキシニトリルリアーゼの固定化について検討した。酵素の固定化は、上記(1)と同様の手順で行った。すなわち、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ溶液(活性: 35U/ml、0.02M HEPES-Na緩衝液(pH6.0)) 1 mlに、各種担体0.1gをそれぞれ加え、4℃で24時間攪拌することにより、酵素タンパク質を担体に吸着固定した。次いで、担体への酵素タンパク質の吸着率を調べた。結果を表2に示した。

【 0 0 4 6 】

【表 2】

各種固定化担体への酵素の吸着率

固定化担体	材質	残存活性 (U/ml)	吸着率 (%)
Toyonite 200(東洋電化工業社製)	粘土系焼結	7.43	75.25
Chromatography Silica Gel FL60D(富士シリシア化学社製)	シリカ系	4.17	86.11
Micro Bead Silica Gel 300A(富士シリシア化学社製)	シリカ系	2.895	90.35
γ-アルミナ KHA-34(住友化学社製)	アルミナ系	18.23	39.23
NeoBead DL(水沢化学工業社製)	アルミナ系	16.08	46.40
ミズカシーブス 13X-488 ゼオライト13X(水沢化学工業社製)	シリカアルミナ系	17.80	40.66
ミズカシーブス Y-540 Y型ゼオライト(水沢化学工業社製)	シリカアルミナ系	16.07	46.45
HSZ-630HOA H-モルデナイト(東ソー社製)	シリカアルミナ系	16.47	45.10
Na・モルデナイト(触媒化成社製)	シリカアルミナ系	18.57	38.09
XZ-16052 ZrO ₂ (ノートン社製)	ZrO ₂	20.11	32.96
XT-25376 TiO ₂ (ノートン社製)	TiO ₂	15.94	46.85
対照	—	30.01	—

【0047】

アルミナ系担体のNeoBead DL(水沢化学工業社製)への吸着率は46.4%、シリカアルミナ系担体のミズカシーブス Y-540 Y型ゼオライト(水沢化学工業社製)への吸着率は46.45%であった。このように、従来のセルロース系担体よりも吸着率の高い固定化担体として、アルミナ系担体及びシリカアルミナ系担体が見出された。

【0048】

【実施例3】 酵素の吸着率に及ぼす細孔径の影響

粘土系焼結担体のToyonite 200及びシリカ系担体のMicro Bead Silica Gelを用い、担体の細孔径と酵素吸着率との関係について検討した。酵素の固定化は、上記(1)と同様の手順で行った。すなわち、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ溶液(活性: 50U/ml、0.02M HEPES-Na緩衝液(pH6.0)) 1mlに、各種担体0.05gをそれぞれ加え、4℃で24時間攪拌することにより、酵素タンパク質を担体に吸着固定した。次いで、担体への酵素タンパク質の吸着率を調べた。Toyonite 200を用いた場合の結果を表3及び図1に、Micro Bead Silica Gelを用いた場合の結果を表4及び図2に示した。

【0049】

【表 3】

Toyonite 200 への吸着率に及ぼす細孔径の影響

固定化担体	細孔径 (nm)	表面積 (m ² /g)	残存活性 (U/ml)	吸着率 (%)
Toyonite 200	28	120	29.4	31.9
Toyonite 200	38	97	22.3	48.4
Toyonite 200	60	43	26.6	38.2
Toyonite 200	72	25	31.6	26.7
対照	—	—	43.1	—

【0 0 5 0】

【表 4】

Micro Bead Silica Gel への吸着率に及ぼす細孔径の影響

固定化担体	細孔径 (nm)	表面積 (m ² /g)	残存活性 (U/ml)	吸着率 (%)
Micro Bead Silica Gel 4B	7	500	34.2	20.7
Micro Bead Silica Gel 150A	16.4	196	27.5	36.3
Micro Bead Silica Gel 5D	18.9	250	22.4	48.0
Micro Bead Silica Gel 200A	20	169	17.2	60.2
Micro Bead Silica Gel 300A	30	112	18.0	58.2
Micro Bead Silica Gel 500A	50	69	24.6	42.9
Micro Bead Silica Gel 800A	80	47	31.4	27.3
Micro Bead Silica Gel 1000A	100	43	32.3	25.2
対照	—	—	43.1	—

【0 0 5 1】

表 3 及び図 1 から明らかなように、粘土系焼結担体 Toyonite 200 においては、細孔径 28～60nm の範囲において比較的高い吸着率が得られ、中でも 38nm 付近で最も高い吸着率が得られた。シリカ系担体 Micro Bead Silica Gel においては 18.9～50nm の範囲において比較的高い吸着率が得られ、中でも 20nm 付近で最も高い吸着率が得られた。

【0 0 5 2】

〔実施例 4〕 酵素の吸着率及び光学活性シアノヒドリンの生成率に及ぼす固定化時 pH の影響

固定化担体としてシリカ系担体の Micro Bead Silica Gel 300A を用い、酵素の吸着率及び光学活性シアノヒドリンの生成率に及ぼす固定化時の pH の影響について調べた。すなわち、まず吸着率に及ぼす pH の影響は、pH 3.81～pH 7.73 の範囲の

様々なpHに調節した、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ（活性：50U/ml）を含有するクエン酸-リン酸緩衝液 1 ml に、担体 0.05g をそれぞれ加え、4℃で24時間攪拌することにより、酵素タンパク質を担体に吸着固定することにより行った。次いで、先と同様にして担体への酵素タンパク質の吸着率を調べた。

【 0 0 5 3 】

次いで、各pHにおいて調製した固定化酵素を濾過により回収後、0.15M クエン酸-Na緩衝液(pH5.0)を用いて洗浄し、固定化酵素が乾燥してほぐれるまで濾過を継続した。得られた固定化酵素に、反応溶媒として酢酸エチル2.5ml、及び反応基質として3-フェノキシベンズアルデヒド99 μ l (0.5mmol) 及び青酸57 μ l (1.5mmol) を加え、室温で16時間、ローラーボトル中で回転させながら光学活性シアノヒドリンの合成反応を行った。反応終了後、生成されたS体3-フェノキシベンズアルデヒドシアノヒドリンの量をHPLCによって測定した。吸着率及び最高のS体3-フェノキシベンズアルデヒドシアノヒドリン生成量を示したpH5.44のときのHPLCピーク面積を100としたときの相対生成量を表5及び図3に示した。

【 0 0 5 4 】

【表5】

吸着率及び光学活性シアノヒドリンの生成率に及ぼす酵素固定化時 pH の影響

pH	残存活性 (U/ml)	吸着率 (%)	反応性
3.81	13.71	44.97	5.22
4.33	7.89	68.32	36.59
4.83	5.66	77.26	52.22
5.44	5.35	78.52	100.00
5.95	5.39	78.36	78.10
6.40	5.23	79.01	76.21
6.79	5.92	76.24	47.97
7.23	7.37	70.42	26.65
7.55	14.5	41.79	11.36
7.73	16.02	35.70	4.26
対照	49.82	—	—

【 0 0 5 5 】

表5及び図3からも明らかなように、Micro Bead Silica Gel 300Aにおいては、吸着率は、pH4.83～6.79の比較的広い範囲で良好であり、生成率はpH5.5において最も高い値を示した。

【 0 0 5 6 】

〔実施例 5〕 酵素の吸着率に及ぼす固定化時の塩濃度の影響

固定化担体としてシリカ系担体のMicro Bead Silica Gel 300Aを用い、酵素の吸着率に及ぼす固定化時の塩濃度の影響について調べた。すなわち、0.02～0.5Mの範囲の様々な塩濃度に調節した、S-ヒドロキシニトリルリアーゼ（活性：50U/ml）を含有するクエン酸-リン酸緩衝液 1 mlに、担体0.05gをそれぞれ加え、4℃で24時間攪拌することにより、酵素タンパク質を担体に吸着固定した。次いで、先と同様にして担体への酵素タンパク質の吸着率を調べた。結果を表 6 及び図 4 に示した。

【 0 0 5 7 】

【表 6】

吸着率に及ぼす酵素固定化時の塩濃度の影響

塩濃度 (M)	残存活性 (U/ml)	吸着率 (%)
0.02	22.14	48.68
0.05	25.37	41.19
0.1	26.27	39.10
0.5	32.93	23.67
対照	43.14	—

【 0 0 5 8 】

表 6 及び図 4 から明らかなように、0.02Mにおいて最も吸着率は高く、さらに酵素固定化時の塩濃度が低い方が吸着率は高いことがわかった。

【 0 0 5 9 】

〔実施例 6〕 反応系内の酸素濃度及びヒドロキノン濃度を減ずる処理を行った合成反応

蒸留によってヒドロキノンを除去した後、窒素を通気して窒素置換したジイソプロピルエーテルを溶媒に用い、S-3-フェノキシベンズアルデヒドシアノヒドリン合成を実施した。

【 0 0 6 0 】

実施例 2 と同様の方法で調製した、粘土系焼結担体のToyonite 200を固定化担体とする固定化酵素に、ジイソプロピルエーテル235.8ml、3-フェノキシベンズ

アルデヒド11.9 g、シアン化水素-ジイソプロピルエーテル溶液 (37.85 g HCN/50 0ml) 64mlを添加し、25℃で攪拌することで反応を行った。

【 0 0 6 1 】

反応がほぼ完結した時点で固定化酵素を分離し、上記と同量の溶媒、基質を添加し、繰り返し反応を行った。図5に示すように、4回の繰り返し反応を行っても、反応速度の低下は見られなかった。また、各回の反応終了時の転換率と生成されたS-3-フェノキシベンズアルデヒドの光学純度を表7に示す。これより、光学純度の低下も起こらないと言える。

【 0 0 6 2 】

【表7】

各反応回における転換率及び光学純度

反応回数	時間(時)	転換率(%)	光学純度(%ee)
1回目	24	95.8	98.16
2回目	19	95.7	98.33
3回目	20	95	98.26
4回目	25.35	93.7	97.73

【 0 0 6 3 】

〔実施例7〕固定化酵素の再使用

実施例1の方法で得たS-ヒドロキシニトリル酵素溶液 (活性: 43U/ml) 14mlに Micro Bead Silica Gel 200A(細孔径20nm)1.5 gを添加し、緩やかに攪拌して酵素を固定化した。固定化酵素を濾過により回収し、余分な水分を通風乾燥によって除去した。この固定化酵素に、1.5Mのシアン化水素を含むt-ブチルメチルエーテル5 mlを添加した後、ベンズアルデヒドを1 Mの濃度になるように添加した。これを室温下、攪拌混合することによってS-マンデロニトリルの合成を行った。反応終了後、固定化酵素と反応液とを分離し、反応液をHPLC分析した。分析の結果、反応開始1.5時間後、ベンズアルデヒドの転化率97.8%で光学純度99.9%ee以上のS-マンデロニトリルが得られた。分離した固定化酵素は上記と同じ量の溶媒、基質を添加して繰り返し反応を行った。結果を表8に示した。表8に示す通り、反応を繰り返しても高い転換率及び生成されたS-マンデロニトリル高い光学純度が維持された。以上のことから、本発明の固定化酵素は、光学活性シアノヒ

ドリンの合成反応において再使用可能な、極めて安定性の高いものであることがわかった。

【 0 0 6 4 】

【表 8】

各反応回における転換率及び光学純度

反応回数	時間(時)	転換率(%)	光学純度(%ee)
1回目	1.5	98.7	>99.9
2回目	2.5	96.9	98.7
3回目	3.0	97.9	99.1
4回目	2.5	97.7	99.2
5回目	2.5	98.0	99.1

【 0 0 6 5 】

【発明の効果】

本発明によって、高い吸着率でS-ヒドロキシニトリルリアーゼが固定化された固定化酵素、該固定化酵素の製造方法及び該固定化酵素を用いる光学活性シアノヒドリンの製造方法が提供される。

【 0 0 6 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON SHOKUBAI CO. , LTD.

<120> The method of synthesis of optical active cyanohydrin

<130> P99-0676

<160> 2

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

ggggaattca tggtaactgc acattttgtt ctgattc

37

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

ggggtcgacc tcacggatta gaagccgccg

30

【 0 0 6 7 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】

固定化担体としてToyonite 200を用いた場合の、酵素の吸着率に及ぼす細孔径の影響を示した図である。

【図 2】

固定化担体としてMicro Bead Silica Gelを用いた場合の、酵素の吸着率に及ぼす細孔径の影響を示した図である。

【図 3】

固定化担体としてMicro Bead Silica Gel 300Aを用いた場合の、酵素の吸着率及び反応性に及ぼすpHの影響を示した図である。

【図 4】

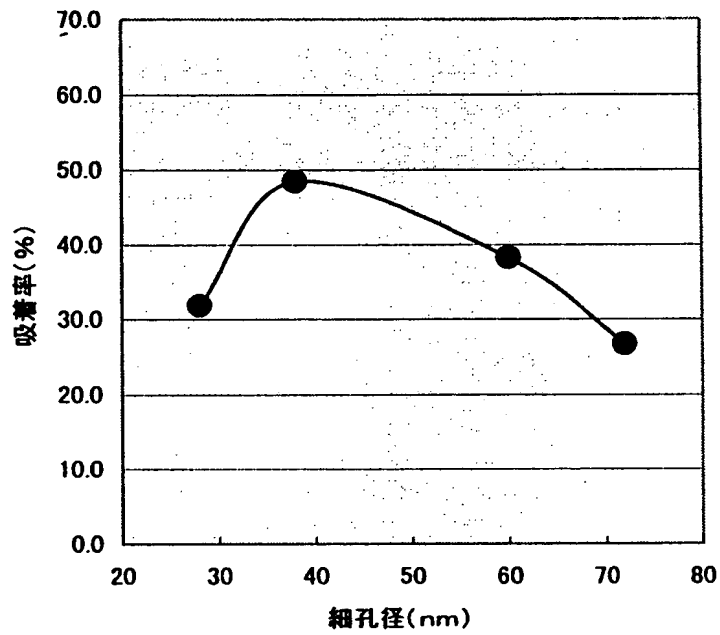
固定化担体としてMicro Bead Silica Gel 300Aを用いた場合の、酵素の吸着率に及ぼす塩濃度の影響を示した図である。

【図 5】

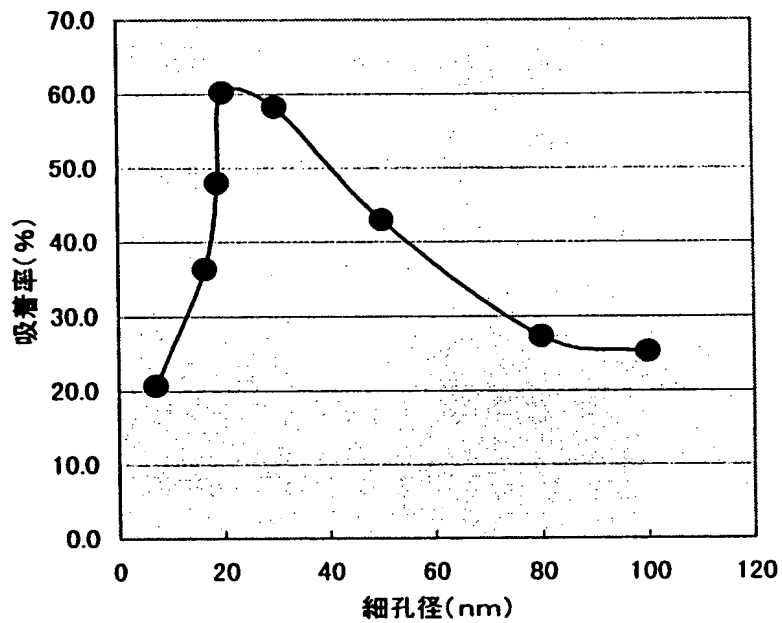
各反応回における転換率の変化を示した図である。

【書類名】 図面

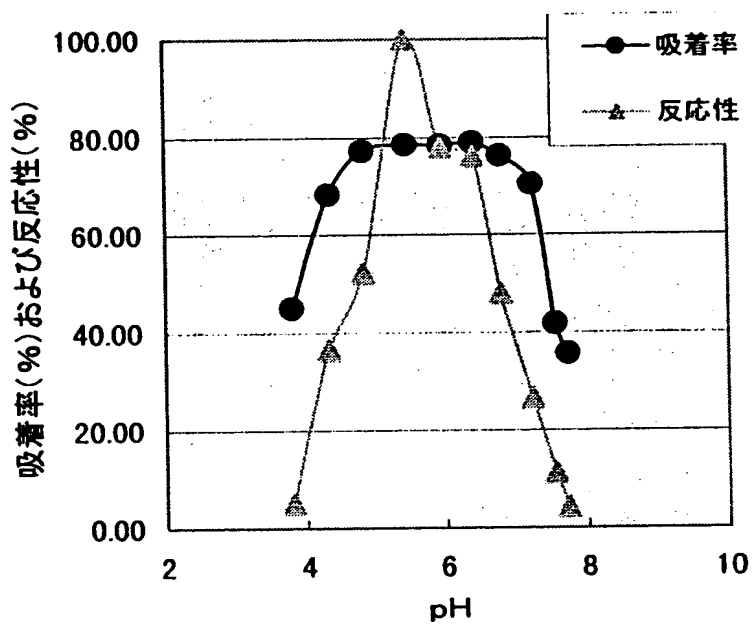
【図 1】



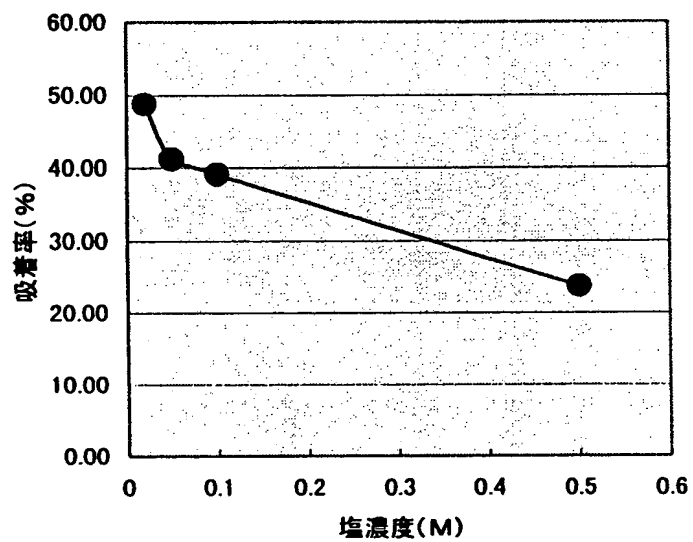
【図 2】



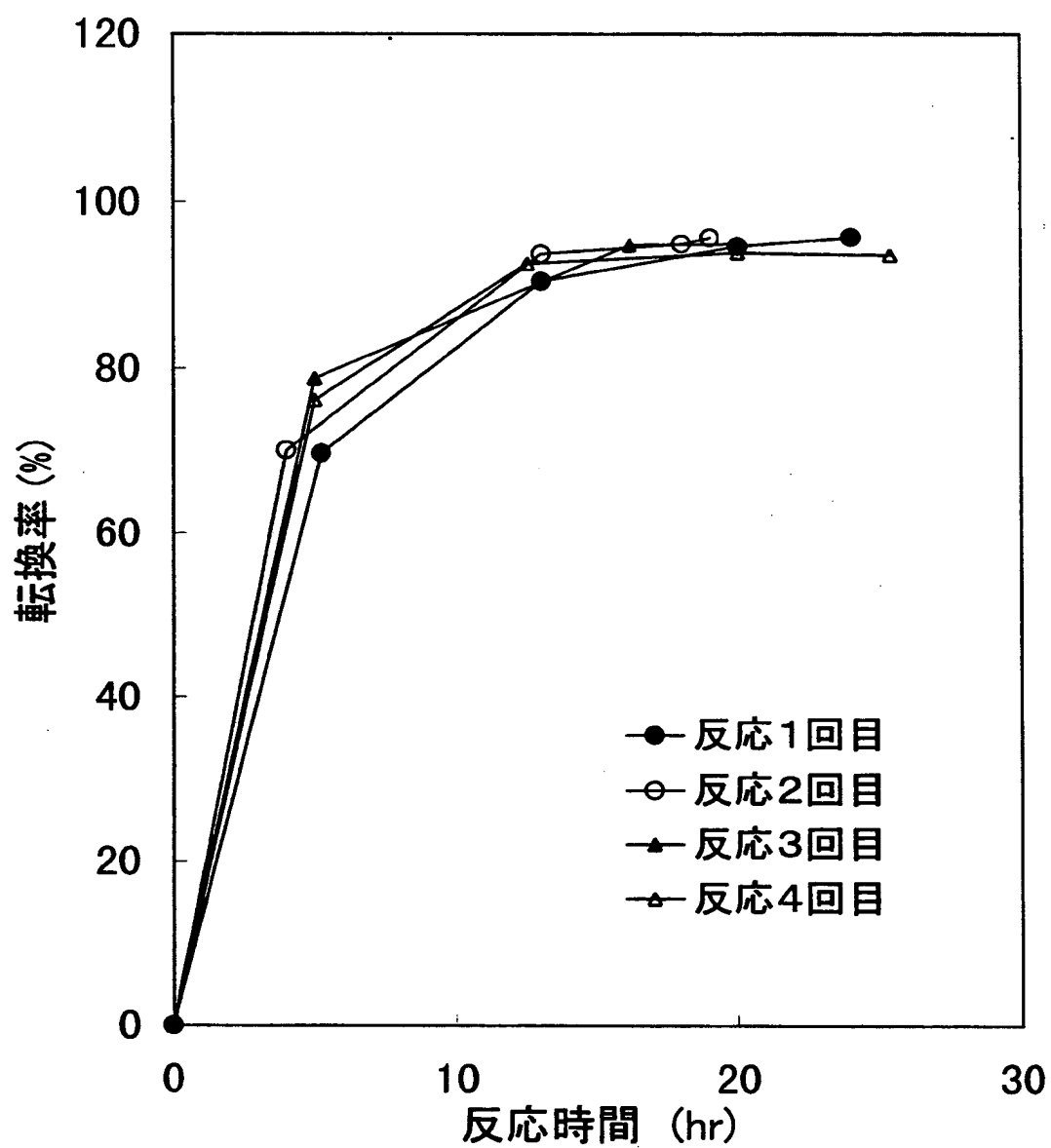
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 光学活性シアノヒドリンの合成方法の提供。

【解決手段】 S-ヒドロキシニトリルリアーゼが、多孔性無機材料からなる担体に固定化されていることを特徴とする固定化酵素。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004628]

1. 変更年月日 1991年 6月11日
[変更理由] 名称変更
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号
氏 名 株式会社日本触媒
2. 変更年月日 2000年12月 6日
[変更理由] 住所変更
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号
氏 名 株式会社日本触媒